



Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（医学）
報告番号	甲第1798号
学位記番号	第1276号
氏名	中村 勇治
授与年月日	令和3年3月24日
学位論文の題名	<p>Constitutive activation of mTORC1 signaling induced by biallelic loss-of-function mutations in SZT2 underlies a discernible neurodevelopmental disease</p> <p>（SZT2 遺伝子の両アレル機能喪失変異は、mTORC1 シグナルの構成的活性化を介して神経発達疾患を引き起こす）</p> <p>PLoS ONE 2019 14(8), e0221482</p>
論文審査担当者	<p>主査： 山川 和弘</p> <p>副査： 澤本 和延, 松川 則之</p>

【背景】

SZT2 遺伝子の両アレル変異は、巨脳症、発達遅滞、難治性てんかんなどの特徴的な表現型を示す疾患を引き起こすことが近年の報告により明らかになった。さらに、その後複数のグループから、*SZT2* を含む複合体がロイシンやアルギニンなど特定のアミノ酸を感知して mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) 経路を抑制的に制御する機能を持つことが報告された。すなわち、*SZT2* の欠損ではアミノ酸飢餓においても mTORC1 が不活性化せず、恒常的に活性化を示す。*PTEN* や *AKT3* 等の mTORC1 経路を構成する遺伝子の研究から、mTORC1 の過剰な活性化では巨脳症、発達遅滞、てんかんなどの表現型を示すことが知られており、*SZT2* 欠失の疾患メカニズムが mTORC1 の活性化に由来することが示唆された。

SZT2 欠損によるヒトの表現型と、その疾患メカニズムに関するエビデンスが集まり始めた一方で、患者はこれまでに 10 例程度しか報告されておらず、また、メカニズム研究は培養細胞やマウスを用いた実験に留まり、実際の *SZT2* 変異を有する患者を集め、患者細胞を用いて mTORC1 の関与を証明した報告はない。そこで、我々は国内の *SZT2* 変異例 2 例からリンパ芽球様細胞 (LCL) を樹立し、mTORC1 の活性変化を調べる研究を計画した。

【患者と方法】

患者 1 は 4 歳女児で、巨脳症、発達遅滞、てんかんを含む *SZT2* 変異例の典型的な症状を示した。*SZT2* 遺伝子に複合ヘテロ接合性に変異が同定された (c.8596dup (p.Tyr2866Leufs*42) および c.2930-17_2930-3delinsCTCGTG)。患者 2 は 2 歳男児で、同じく典型的な症状を示し、*SZT2* 遺伝子に複合ヘテロ接合性に変異が同定された (c.3947dup (p.Glu1317Glyfs*4) および c.2929+1G>A)。

患者 2 名から採取した血液をフィコール分離し、単核球層のみを抽出した後、EB ウイルスを感染させ LCL 株として樹立した。細胞はダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) に 10% ウシ胎児血清 (FBS) を加え、培養した。

アミノ酸飢餓状態での解析には、10%FBS を加えたアミノ酸フリーの DMEM 培地で 1 時間インキュベートした。その後、アミノ酸負荷への反応を見るために LCL を 10 分間 (短時間) および 1 時間 (長時間) アミノ酸含有 DMEM 培地でインキュベートした。アミノ酸飢餓、負荷状態での LCL をウエスタンブロットおよび免疫染色にて解析し、mTORC1 の活性変化を調べた。

【結果】

ウエスタンブロットで、*SZT2* より下流の mTORC1 経路構成要素である S6K および S6 のリン酸化レベルを調べた。コントロールでは、アミノ酸の飢餓および短時間負荷状態では phosphorylated S6K, S6 のシグナルが増加しないのに対し、患者ではこれらの状態でも有意にリン酸化レベルが上昇していた。アミノ酸を 1 時間負荷すると、どちらも高度にリン酸化し、患者とコントロールとの差はなかった。つまり、*SZT2* 変異患者で

はアミノ酸非存在下でも mTORC1 が抑制されず、恒常的に活性化していることが示唆された。

mTORC1 が活性化した状態では mTOR 蛋白とライソソームとが共局在する。免疫染色で、患者 LCL ではコントロールと比較してアミノ酸飢餓時においても mTOR とライソソームが有意に共局在を示し、ウェスタンブロットと矛盾しない結果であった。

【考察】

SZT2 変異を有する患者で mTORC1 が恒常的に活性化していることを明らかにした。SZT2 がアミノ酸環境に応じて mTORC1 を抑制的に制御することが、正常な脳発達に重要であることが示唆された。我々が確立した解析系は、患者血液を用いて比較的簡便に実施することができるため、今後網羅的遺伝子解析により発見される病的意義不明の SZT2 変異に対し有効な診断方法となる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

【背景】SZT2 遺伝子の両アレル変異は、巨脳症、発達遅滞、難治性てんかんなどの特徴的な表現型を示す疾患を引き起こす。SZT2 を含む複合体がロイシンやアルギニンなど特定のアミノ酸を感知して mechanistic target of rapamycin complex 1 (mTORC1) 経路を抑制的に制御する機能を持ち、SZT2 欠失は mTORC1 の過剰な活性化を引き起こす。しかし、実際の SZT2 変異を有する患者の細胞を用いて mTORC1 の関与を証明した報告はない。そこで、我々は国内の SZT2 変異例 2 例からリンパ芽球様細胞 (LCL) を樹立し、mTORC1 の活性変化を調べる研究を計画した。【患者と方法】患者 1 は 4 歳女児で、巨脳症、発達遅滞、てんかんを含む SZT2 変異例の典型的な症状を示した。SZT2 遺伝子に複合ヘテロ接合性に変異が同定された (c.8596dup (p.Tyr2866Leufs*42) および c.2930-17_2930-3delinsCTCGTG)。患者 2 は 2 歳男児で、同じく典型的な症状を示し、SZT2 遺伝子に複合ヘテロ接合性に変異が同定された (c.3947dup (p.Glu1317Glyfs*4) および c.2929+1G>A)。患者 2 名から採取した血液をフィコール分離し、単核球層のみを抽出した後、EB ウイルスを感染させ LCL 株として樹立した。細胞はダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) に 10%ウシ胎児血清 (FBS) を加え、培養した。アミノ酸飢餓状態での解析には、10%FBS を加えたアミノ酸フリーの DMEM 培地で 1 時間インキュベートした。その後、アミノ酸負荷への反応を見るために LCL を 10 分間 (短時間) および 1 時間 (長時間) アミノ酸含有 DMEM 培地でインキュベートした。アミノ酸飢餓、負荷状態での LCL をウェスタンブロットおよび免疫染色にて解析し、mTORC1 の活性変化を調べた。【結果】ウェスタンブロットで、S6K および S6 のリン酸化レベルを調べた。コントロールでは、アミノ酸の飢餓および短時間負荷状態では phosphorylated S6K, S6 のシグナルが増加しないのに対し、患者ではこれらの状態でも有意にリン酸化レベルが上昇していた。アミノ酸を 1 時間負荷すると、どちらも高度にリン酸化し、患者とコントロールとの差はなかった。つまり、SZT2 変異患者ではアミノ酸非存在下でも mTORC1 が抑制されず、恒常的に活性化していることが示唆された。mTORC1 が活性化した状態では mTOR 蛋白とライソソームとが共局在する。免疫染色で、患者 LCL ではコントロールと比較してアミノ酸飢餓時においても mTOR とライソソームが有意に共局在を示し、ウェスタンブロットと矛盾しない結果であった。【考察】SZT2 変異を有する患者で mTORC1 が恒常的に活性化していることを明らかにした。我々が確立した解析系は比較的簡便に実施することができるため、今後網羅的遺伝子解析により発見される病的意義不明の SZT2 変異に対し有効な診断方法となる可能性がある。

【審査の内容】約 20 分間のプレゼンテーションの後に、第一副査の澤本和延教授から、イントロンにおける遺伝子変異の解釈や、LCL を用いた実験結果がどの程度脳組織での病態に適用可能なのか、などを中心に 7 項目の質問がされた。第二副査の松川則之教授から、患者変異を模したモデル等での研究への展望などを中心に 2 項目の質問がされた。主査の山川和弘教授から、本遺伝子による疾患における特徴的な症状、本疾患におけるてんかん発症メカニズムなどを中心に 10 項目の質問がなされた。いずれの質問も概ね満足のいく回答が得られ、学位論文の主旨を十分に理解していると判断した。本研究は、SZT2 遺伝子変異例に対して機能解析を行い、臨床・研究の両面において意義のある結果が得られた研究である。以上をもって、本論文の著者には博士 (医学) の称号と与えるに相応しいと判断した。

論文審査担当者 主査 山川 和弘

副査 澤本 和延、松川 則之